

研究用

TaKaRa

One Step SYBR[®] PrimeScript[®] RT-PCR Kit (Perfect Real Time)

説明書

One Step SYBR® PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) は、SYBR® Green I * 1 を含む 1 ステップリアルタイム RT-PCR 専用のキットです* 2。RT-PCR を 1 チューブ内で連続的に行えるため、操作が簡便でコンタミネーションの心配がありません。また、増幅産物をリアルタイムで検出でき、PCR 後に電気泳動などで確認する必要がありません。RNA ウイルスなど微量 RNA の検出に最適です。

反応には伸長性に優れ、短時間の反応で効率よく cDNA 合成が可能な PrimeScript RTase と PCR 酵素として定評のある *TaKaRa Ex Taq HS* を用い、反応系を 1 ステップ RT-PCR 用に最適化しているので、低濃度の鋳型でも高感度な検出が可能です。反応特異性も向上しており、SYBR® Green I 検出で高い定量性が得られます。

本製品の適応機種

- Thermal Cycler Dice Real Time System II (製品コード TP900/TP960)
- Thermal Cycler Dice Real Time System Single (製品コード TP850/TP870)
- Thermal Cycler Dice Real Time System *Lite* (製品コード TP700/TP760)
- Smart Cycler® System * 3/Smart Cycler® II System * 3 (Cepheid 社)
- ABI PRISM® 7000/7700、Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies 社)
- LightCycler® (Roche Diagnostics 社) など

* 1 : Molecular Probes Inc. より研究用試薬として SYBR® Green I ライセンスを受けています。SYBR® は Molecular Probes Inc. の登録商標です。

* 2 : TaqMan® プローブを用いる 1 ステップリアルタイム RT-PCR には、One Step PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) を使用してください。(TaqMan® は、Roche Diagnostics 社のトレードマークです。The 5' nuclease process is covered by patents owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd. Purchase of the product does not provide a license to use this patented technology.)

* 3 : Smart Cycler® は Cepheid 社の登録商標です。

I. 原理

One Step SYBR® PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) では、逆転写酵素 PrimeScript RTase による RNA からの cDNA 合成と *TaKaRa Ex Taq HS* による PCR 増幅を 1 チューブ内で連続的に行います。PCR 増幅産物は、SYBR® Green I によりリアルタイムでモニタリングします。

1. PCR

PCR 法は微量 DNA から目的の遺伝子断片のみを増幅させる技術です。DNA の熱変性、プライマーのアニーリング、DNA ポリメラーゼによる伸長反応の 3 ステップからなる工程を 1 サイクルとし、これを繰り返すことで、短時間のうちに目的遺伝子断片を 100 万倍にまで増幅させることが出来ます。

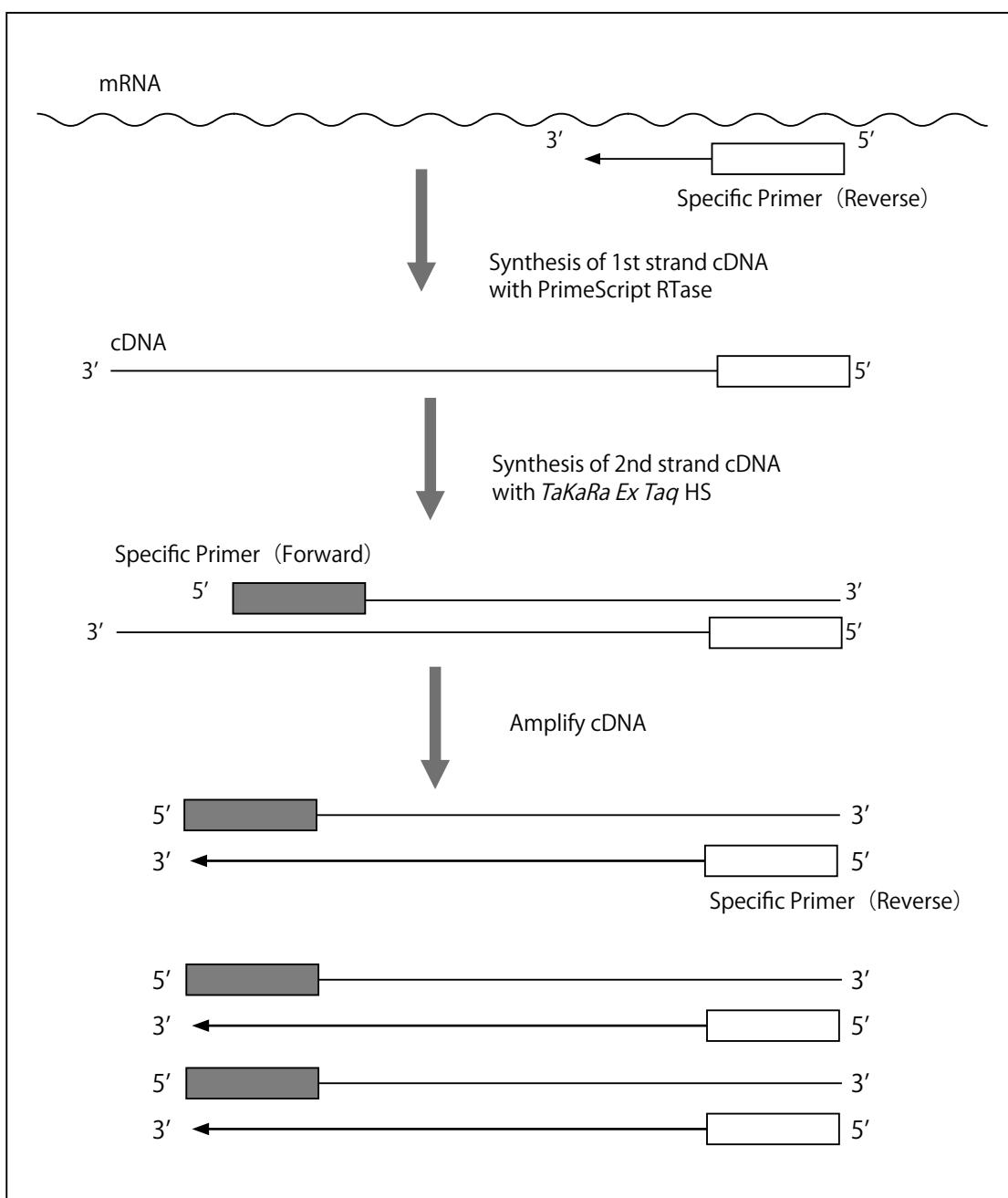
本製品では、増幅に Hot Start PCR 用酵素 *TaKaRa Ex Taq HS* を使用しているため、反応液調製時などサイクル前のミスプライミングやプライマーダイマーに由来する非特異的増幅を防ぐことができ、高感度の検出が可能になります。

2. RT-PCR

RNA は PCR 法の直接の鋳型とはなりませんが、逆転写酵素により RNA から cDNA を合成することにより、PCR 法を RNA 解析に応用することが可能になります。これが、RT-PCR 法であり、高感度な RNA 検出方法です。

本製品では、1 Step RT-PCR を行います。その原理を次ページに示します。

1 Step RT-PCR では、PCR 用の Specific Primer (Reverse) を用いて逆転写反応を行い、合成された cDNA を鋳型として Specific primer (Forward、Reverse) による PCR 増幅を行います。(Random Primer および Oligo dT Primer を逆転写反応に用いることはできません。)



1 Step RT-PCR 法の原理

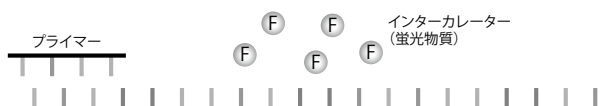
3. 蛍光検出法

インターカレーター法：

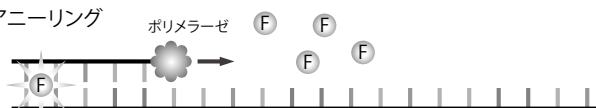
二本鎖 DNA に結合することで蛍光を発する試薬（インターカレーター：SYBR® Green I など）を反応系に加え、増幅に伴う蛍光を検出する方法です。

ポリメラーゼ反応によって合成された二本鎖 DNA にインターカレーターが結合すると、蛍光を発します。この蛍光強度を検出することで、定量だけでなく増幅 DNA の融解温度を測定することもできます。

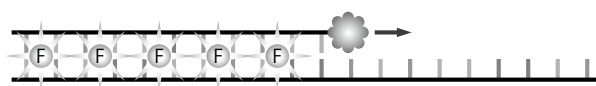
1) 熱変性



2) プライマーのアニールング



3) 伸長反応



II. キットの内容 (100 反応分；50 µl 反応系)

1. 2 × One Step SYBR® RT-PCR Buffer III * 1	840 µl × 3
2. TaKaRa Ex Taq HS (5 U/µl)	100 µl
3. PrimeScript RT enzyme Mix II * 2	100 µl
4. RNase Free dH ₂ O	1.25 ml × 2
5. ROX Reference Dye (50×conc.) * 3	100 µl
6. ROX Reference Dye II (50×conc.) * 3	100 µl

* 1：dNTP Mixture、Mg²⁺および SYBR® Green I を含む

* 2：RNase Inhibitor を含む。

* 3：Life Technologies 社製リアルタイム PCR 装置など、ウェル間の蛍光シグナルの補正を行う装置で解析する場合に使用します。

◆ ROX Reference Dye を添加する機種

- ・ Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Life Technologies 社)
- ・ ABI PRISM® 7000/7700 (Life Technologies 社)

◆ ROX Reference Dye II を添加する機種

- ・ Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies 社)

◆ 添加の必要がない機種

- ・ Thermal Cycler Dice Real Time System II (製品コード TP900/TP960) ほか
- ・ LightCycler® (Roche Diagnostics 社)
- ・ Smart Cycler® System/Smart Cycler® II System (Cepheid 社)

キット以外に必要な試薬、機器 (主なもの)

1. リアルタイム PCR 用遺伝子増幅システム (authorized instruments)
2. 専用反応チューブあるいはプレート
3. PCR 用プライマー*
4. マイクロピペットおよびチップ (オートクレーブ処理したもの)

*：PCR 用プライマーの設計方法は、「VIII. B. プライマー設計について」をご参照ください。

III. 保存

− 20℃

2 × One Step SYBR® RT-PCR Buffer III は、**遮光して** − 20℃にて保存すること。

IV. 特長

- (1) 1 ステップリアルタイム RT-PCR により、RNA ウイルスなど微量 RNA の解析を迅速かつ正確に行うことができます。
- (2) PCR には、Hot Start PCR 用酵素 *TaKaRa Ex Taq* HS を用いています。バッファー系は、リアルタイム PCR 用に最適化されているため、増幅効率が良く、高感度な検出が可能です。また、バッファーは、SYBR® Green I をあらかじめ含む 2× 濃度のプレミックスなので、反応液の調製が簡単です。

V. 操作上の注意

本キットを使用する場合の注意事項です。**使用前に必ずお読みください。**

- (1) 反応液は、数回〜 10 回分程度をまとめて Master Mix (RNase Free dH₂O、バッファー、酵素等の混液) を調製すると便利です。Master Mix を作ることで、ピペッティングによるロスや、試薬の分注、攪拌回数が少なくなり、正確な試薬の分注を行うことができます。その結果、実験間のデータのばらつきも防げます。
- (2) *TaKaRa Ex Taq* HS、PrimeScript RT enzyme Mix II は、使用前に軽く遠心して、試薬をチューブの底に落としてください。酵素は 50%グリセロール溶液で粘度が高いため、注意深くゆっくりとピペッティングを行ってください。これらの酵素類は使用前まで − 20℃で保存し、使用後は直ちに − 20℃に保存してください。
- (3) 2 × One Step SYBR® RT-PCR Buffer III は、融解時に不溶物が見られる場合がありますが、溶解すれば問題ありません。Vortex 等を使用して、完全に溶解してから使用してください。
- (4) 試薬の分注を行うときは必ず新しいディスポーザブルチップを用い、サンプル間のコンタミネーションを極力防止してください。
- (5) 本キットによる逆転写反応には、特異的なプライマーを用います。Random Primer や Oligo dT Primer は使用できません。

VI. 操作

(RNA 調製方法は、「VIII. A. RNA サンプルの調製について」をご参照ください。)

< Thermal Cyclor Dice Real Time System // を用いる場合の操作方法 >

1. 下記に示す反応液を氷上で調製する。

< 1 反応あたり >

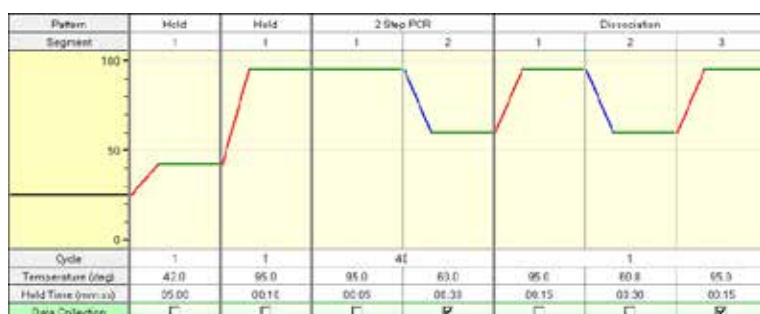
試薬	使用量	最終濃度
2 × One Step SYBR® RT-PCR Buffer III	12.5 μ l	1 ×
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/ μ l)	0.5 μ l	
PrimeScript RT enzyme Mix II	0.5 μ l	
PCR Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M * 1
PCR Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l	0.2 μ M * 1
total RNA	2 μ l	* 2
RNase Free dH ₂ O	8.5 μ l	
Total	25 μ l	

* 1 : 最終 primer 濃度は 0.2 μ M で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ~ 1.0 μ M の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

* 2 : total RNA 10 pg ~ 100 ng を template として使用することが望ましい。

2. 反応チューブまたはプレートを遠心機で軽く遠心後、Thermal Cyclor Dice Real Time System // にセットし、反応を開始する。

反応は、下記の標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずは、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください。T_m 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 ステップ PCR を行います。(詳しくは、11 ページの「実験条件の選び方」をご参照ください。)



Pattern 1 : 逆転写反応

Hold

42°C 5 分

95°C 10 秒

Pattern 2 : PCR 反応

Cycle : 40

95°C 5 秒

60°C 30 秒

Pattern 3 : Dissociation

※使用上の注意

本製品に使用している TaKaRa Ex Taq HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 Taq 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95°C (5 ~) 15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。

PCR 反応前に逆転写酵素の熱失活を行うには、通常 95°C 10 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

Thermal Cyclor Dice Real Time System // の解析方法は、Thermal Cyclor Dice Real Time System の取扱説明書と VII. 実験例をご参照ください。

< Smart Cycler® II System を用いる場合の操作方法>

1. 下記に示す反応液を氷上で調製する。

< 1 反応あたり>

試薬	使用量	最終濃度
2 × One Step SYBR® RT-PCR Buffer III	12.5 µl	1 ×
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/µl)	0.5 µl	
PrimeScript RT enzyme Mix II	0.5 µl	
PCR Forward Primer (10 µM)	0.5 µl	0.2 µM *1
PCR Reverse Primer (10 µM)	0.5 µl	0.2 µM *1
total RNA	2 µl	*2
RNase Free dH ₂ O	8.5 µl	
Total	25 µl	

* 1 : 最終 primer 濃度は 0.2 µM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ~ 1.0 µM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

* 2 : total RNA 10 pg ~ 100 ng を template として使用することが望ましい。

2. 反応チューブを Smart Cycler® 用遠心機で軽く遠心後、Smart Cycler® にセットし、反応を開始する。

反応は、下記の標準プロトコルで行うことをお勧めします。まずは、このプロトコルを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください。T_m 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 ステップ PCR を行います。(詳しくは、11 ページの「実験条件の選び方」をご参照ください。)

Stage 1 Repeat 1 times. 2-Temperature Cycle <table border="1"> <thead> <tr> <th>Deg/Sec</th> <th>Temp</th> <th>Secs</th> <th>Optics</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>NA</td> <td>42.0</td> <td>300</td> <td>Off</td> </tr> <tr> <td>NA</td> <td>95.0</td> <td>10</td> <td>Off</td> </tr> </tbody> </table> ☐ Advance to Next Stage	Deg/Sec	Temp	Secs	Optics	NA	42.0	300	Off	NA	95.0	10	Off	Stage 2 Repeat 40 times. 2-Temperature Cycle <table border="1"> <thead> <tr> <th>Deg/Sec</th> <th>Temp</th> <th>Secs</th> <th>Optics</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>NA</td> <td>95.0</td> <td>5</td> <td>Off</td> </tr> <tr> <td>NA</td> <td>60.0</td> <td>20</td> <td>On</td> </tr> </tbody> </table> ☐ Advance to Next Stage	Deg/Sec	Temp	Secs	Optics	NA	95.0	5	Off	NA	60.0	20	On	Stage 3 Melt Curve <table border="1"> <thead> <tr> <th>Start</th> <th>End</th> <th>Optics</th> <th>Deg/Sec</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>60.0</td> <td>95.0</td> <td>Ch1</td> <td>0.2</td> </tr> </tbody> </table>	Start	End	Optics	Deg/Sec	60.0	95.0	Ch1	0.2
Deg/Sec	Temp	Secs	Optics																															
NA	42.0	300	Off																															
NA	95.0	10	Off																															
Deg/Sec	Temp	Secs	Optics																															
NA	95.0	5	Off																															
NA	60.0	20	On																															
Start	End	Optics	Deg/Sec																															
60.0	95.0	Ch1	0.2																															

Stage 1 : 逆転写反応
Hold

42°C 5 分

95°C 10 秒

Stage 2 : PCR 反応

Repeat : 40 times

95°C 5 秒

60°C 20 秒

Stage 3 : Melt Curve

※使用上の注意

本製品に使用している TaKaRa Ex Taq HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 Taq 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95°C (5 ~) 15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。

PCR 反応前に逆転写酵素の熱失活を行うには、通常 95°C 10 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、リアルタイム PCR 装置の取扱説明書をご参照ください。

< ABI PRISM® 7000/7700 および Applied Biosystems 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System を用いる場合の操作方法 >

※各機種の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す反応液を氷上で調製する。

< 1 反応あたり >

試薬	使用量	使用量	最終濃度
2 × One Step SYBR® RT-PCR Buffer III	10 μl	25 μl	1 ×
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/μl)	0.4 μl	1 μl	
PrimeScript RT enzyme Mix II	0.4 μl	1 μl	
PCR Forward Primer (10 μM)	0.4 μl	1 μl	0.2 μM * 1
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.4 μl	1 μl	0.2 μM * 1
ROX Reference Dye or Dye II (50×) * 3	0.4 μl	1 μl	
total RNA	2 μl	4 μl* 2	
RNase Free dH ₂ O	6 μl	16 μl	
Total	20 μl* 2	50 μl* 4	

* 1 : 最終 primer 濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ~ 1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

* 2 : 50 μl 反応液あたり total RNA 20 pg ~ 200 ng を template として使用することが望ましい。

* 3 : ROX Reference Dye II (50×) は、ROX Reference Dye (50×) より濃度が低く設定されています。7500/7500 Fast Real-Time PCR System で解析する場合には、ROX Reference Dye II (50×) の使用を推奨します。

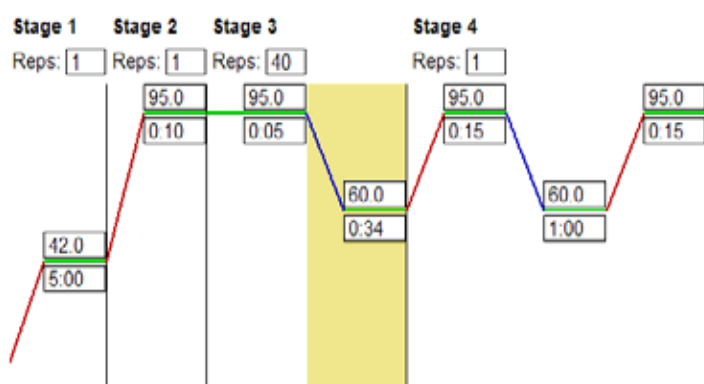
ABI PRISM® 7000/7700 および 7300 Real-Time PCR System には、ROX Reference Dye (50 ×) を使用してください。

* 4 : 各装置の推奨容量に従って調製する。

2. 反応を開始する。

反応は、下記の標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずは、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください。T_m 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 ステップ PCR を行います。(詳しくは、11 ページの「実験条件の選び方」をご参照ください。)

< ABI PRISM® 7000/7700、7300/7500 Real-Time PCR System >



Stage 1,2 : 逆転写反応

Reps : 1

42°C 5 分

95°C 10 秒

Stage 3 : PCR 反応

Reps : 40

95°C 5 秒

60°C 30 ~ 34 秒*

Stage 4 : Dissociation Protocol

* : 7700 では 30 秒に、7000 および 7300 では 31 秒に、7500 では 34 秒に設定します。

< 7500 Fast Real-Time PCR System >

Holding Stage

42°C 5 分

95°C 10 秒

Cycling Stage

Number of Cycles : 40

95°C 3 秒

60°C 30 秒

Melt Curve Stage

※使用上の注意

本製品に使用している *TaKaRa Ex Taq HS* はポリメラーゼ活性を抑制する抗 *Taq* 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95°C (5 ~) 15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。

PCR 反応前に逆転写酵素の熱失活を行うには、通常 95°C 10 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。
解析方法は、リアルタイム PCR 装置の取扱説明書をご参照ください。

< LightCycler® を用いる場合の操作方法 >

※ LightCycler® (Roche Diagnostics 社) の取扱説明書に従って操作してください。

1. 下記に示す反応液を氷上で調製する。

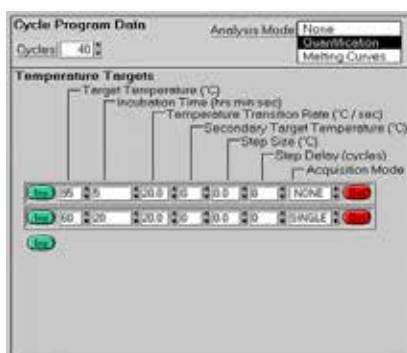
< 1 反応あたり >

試薬	使用量	最終濃度
2 × One Step SYBR® RT-PCR Buffer III	10 µl	1 ×
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/µl)	0.4 µl	
PrimeScript RT enzyme Mix II	0.4 µl	
PCR Forward Primer (10 µM)	0.4 µl	0.2 µM *1
PCR Reverse Primer (10 µM)	0.4 µl	0.2 µM *1
total RNA	2 µl	*2
RNase Free dH ₂ O	6.4 µl	
Total	20 µl	

* 1 : 最終 primer 濃度は 0.2 µM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題があるときは 0.1 ~ 1.0 µM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

* 2 : total RNA 10 pg ~ 100 ng を template として使用することが望ましい。

2. PCR キャピラリーを遠心機で軽く遠心後、LightCycler® にセットし、反応を開始する。
反応は、下記の標準プロトコールで行うことをお勧めします。まずは、このプロトコールを試し、必要に応じて PCR 反応条件を至適化してください。T_m 値が低めのプライマーなど、シャトル PCR での反応が難しい場合には、3 ステップ PCR を行います。(詳しくは、11 ページの「実験条件の選び方」をご参照ください。)



Stage 1 : 逆転写反応

42°C 5 分 20°C/秒

95°C 10 秒 20°C/秒

1 サイクル

Stage 2 : PCR 反応

95°C 5 秒 20°C/秒

60°C 20 秒 20°C/秒

40 サイクル

Stage 3 : 融解曲線分析

95°C 0 秒 20°C/秒

65°C 15 秒 20°C/秒

95°C 0 秒 0.1°C/秒

Stage2 : PCR 反応

※使用上の注意

本製品に使用している TaKaRa Ex Taq HS はポリメラーゼ活性を抑制する抗 Taq 抗体を利用したホットスタート PCR 用酵素です。他社の化学修飾タイプのホットスタート PCR 酵素で必要な PCR 反応前の 95°C (5 ~) 15 分の活性化ステップは行わないでください。必要以上の熱処理を加えると酵素活性が低下し、増幅効率、定量精度に影響を及ぼす傾向があります。

PCR 反応前に逆転写酵素の熱失活を行うには、通常 95°C 10 秒で充分です。

3. 反応終了後、増幅曲線と融解曲線を確認し、定量を行う場合は検量線を作成する。

解析方法は、リアルタイム PCR 装置の取扱説明書をご参照ください。

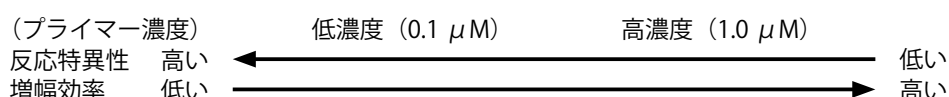
実験条件の選び方

推奨条件で良好な反応性が得られない場合には、下記の要領でプライマー濃度や PCR 条件の検討を行ってください。また、反応系によっては、特性が異なる他のリアルタイム RT-PCR 試薬を用いることにより、反応性が大きく改善することもあります。実験条件を選ぶ際には、反応特異性と増幅効率の両方を考慮して総合的に判断します。両方のバランスが取れた実験系では広い濃度範囲で正確な定量が可能です。

- 反応特異性が高い実験系
 - ・ No Template Control でプライマーダイマーなどの非特異的増幅が生じない。
 - ・ 目的産物以外の非特異的増幅が生じない。
- 増幅効率が高い実験系
 - ・ 増幅産物がより早いサイクルで検出される (Ct 値が小さい)。
 - ・ PCR 増幅効率が高い (理論値である 100%に近い)。

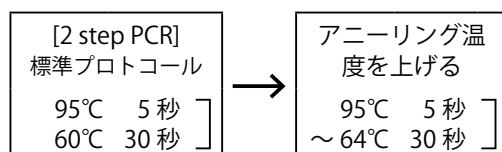
【プライマー濃度の検討】

プライマー濃度と反応特異性および増幅効率の間には、以下のような関係があります。反応特異性を上げるにはプライマー濃度を下げ、増幅効率を上げるにはプライマー濃度を上げます。

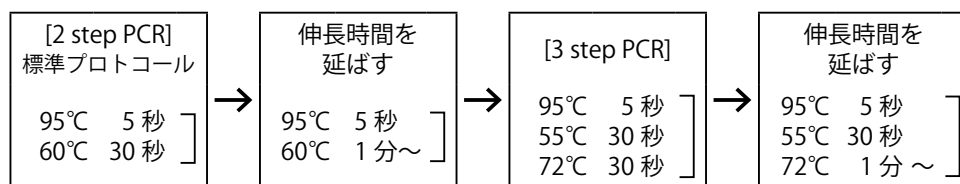


【PCR 条件の検討】

- 反応特異性を上げるには—
アニーリング温度を上げると反応特異性が改善することがあります。増幅効率とのバランスを確認しながら、検討を行ってください。



- 増幅効率を上げるには—
伸長反応時間を延ばすか 3 step PCR に変更することにより、増幅効率が改善することがあります。以下の手順で検討を行ってください。



【各種リアルタイム RT-PCR 試薬について】

タカラバイオでは、SYBR® Green Assay 用の 1 ステップリアルタイム RT-PCR 試薬と 2 ステップリアルタイム RT-PCR 試薬を各種販売しています。高感度検出および多検体の解析には 1 ステップリアルタイム RT-PCR が適していますが、多遺伝子の解析には 2 ステップリアルタイム RT-PCR の方が便利な場合もあります。また、2 ステップリアルタイム RT-PCR では、より特異性の高い反応が可能です。実験目的に応じて使い分けてください。

なお、1 ステップリアルタイム RT-PCR 試薬としては、本製品の他に、反応特異性に優れた One Step SYBR® PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR096A/B) を販売しています。本製品で十分な反応特異性が得られない場合にお試しください。

VII. 実験例

Rat Rplp2 (ribosomal protein, lange P2) の検出

(Thermal Cycler Dice Real Time System を使用)

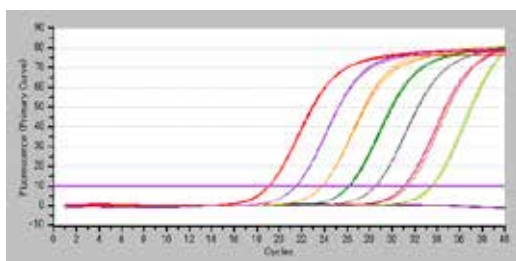
本製品および Perfect Real Time サポートシステムで検索・合成したプライマーを用いて total RNA から Rat Rplp2 の検出を行った。

1. 方法

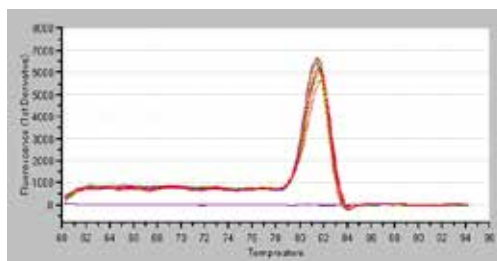
Rat Liver から調製した total RNA 6.4 pg ~ 100 ng および滅菌水 (no template control) を鋳型として、リアルタイム 1 Step RT-PCR 反応を行った。

2. 結果

PCR 増幅産物のリアルタイムモニタリング

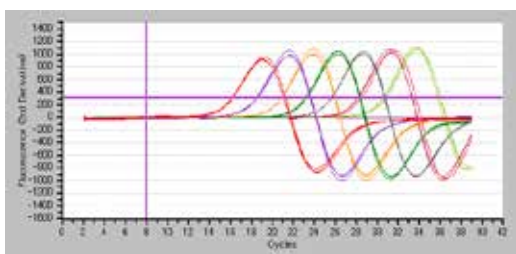


増幅曲線

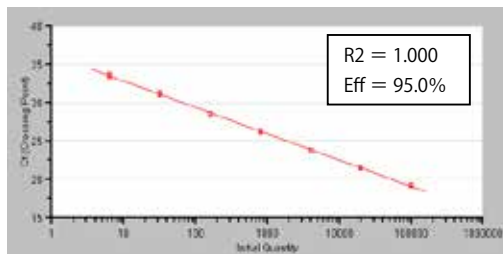


融解曲線

反応終了後、増幅曲線の 2nd derivative から Ct 値を求め、検量線を作成



2nd derivative



検量線

3. 考察

total RNA 6.4 pg ~ 100 ng で目的遺伝子を検出できました。融解曲線から、いずれの鋳型量でも単一の増幅産物が得られていることがわかります。また、検量線の直線性は高く、実験した濃度範囲で正確な定量が可能だと考えられます。

VIII. Appendix

A. RNA サンプルの調製について

本キットは RNA から cDNA 合成、PCR 増幅を行うキットです。cDNA 合成を成功させるためには純度の高い RNA サンプルを得ることが大切です。そのためには、細胞内に含まれる RNase の作用を抑えること、また使用する器具や溶液など外部からの RNase の混入を避けることが大切です。RNA 調製にあたっては、実験者の汗や唾液に含まれる RNase の混入を防ぐため作業中は不必要に話さず、清潔なディスポーザブルグローブを着用し、RNA 調製専用の実験台を設けるなどの細心の注意を払ってください。

[器具]

実験器具に関しては、可能な限りディスポーザブルのプラスチック製品を使用してください。一般のガラス器具は以下の処理の(1)あるいは(2)を行ってから使用してください。

- (1) 乾熱滅菌 (180℃、60 分)
- (2) ガラス器具を 0.1% ジエチルピロカーボネート (DEPC) 溶液で、37℃、12 時間処理する。残留 DEPC を除去するためにオートクレーブ処理 (120℃、30 分) する。

RNA 実験に用いる器具 (プラスチックおよびガラス) は、他の器具と区別して RNA 専用として用いることをお勧めします。

[溶液]

実験に用いる試薬溶液は、上記の条件で乾熱滅菌 (180℃、60 分) あるいは DEPC 処理したガラス器具で調製し、用いる蒸留水はあらかじめ 0.1% DEPC 処理を行いオートクレーブしてください。用いる溶液、蒸留水はすべて RNA 実験専用としてお使いください。

[RNA サンプルの調製法]

RT-PCR 法に用いる RNA サンプルは、通常少量の RNA があればよい場合が多いので簡便な精製法が用いられることもありますが、できれば高純度に精製した RNA を使用することをお勧めします。

培養細胞や組織サンプルからの高純度 total RNA の調製には、スピンカラムタイプの NucleoSpin® RNA (製品コード 740955.10/.50/.250) や AGPC 法の簡便化試薬である RNAiso Plus (製品コード 9108/9109) が便利です。

B. プライマー設計について

リアルタイム PCR を効率的に行うには、反応性の良いプライマーを設計することが重要です。以下のガイドラインに沿って、増幅効率がよく、非特異的反応が起こらないプライマーを設計してください。

■増幅産物

増幅サイズ	80 ～ 150 bp が最適（300 bp までは増幅可能）
-------	---------------------------------

■プライマー

長さ	17 ～ 25 mer
GC 含量	40 ～ 60%（望ましくは、45 ～ 55%）
Tm	Forward primer と Reverse primer の Tm 値が大きく異なること Tm 値の計算は、専用のソフトウェアで行う OLIGO™* 1：63 ～ 68℃ Primer3 * 2：60 ～ 65℃
配列	全体的に塩基の偏りがない配列にする 部分的に GC リッチあるいは AT リッチな配列は避ける（特に 3' 末端） T/C の連続（polypyrimidine）は避ける A/G の連続（polypurine）は避ける
3' 末端配列	3' 末端が GC リッチあるいは AT リッチな配列は避ける 3' 末端塩基は、G または C が望ましい 3' 末端塩基が T であるプライマーは避けたほうがよい
相補性	プライマー内部およびプライマー間での 3 base 以上の相補的配列を避ける プライマー 3' 末端が 2 base 以上相補する配列を避ける
特異性	BLAST 検索でプライマーの特異性を確認する* 3

* 1：OLIGO™ Primer Analysis Software（Molecular Biology Insight 社）

* 2：Primer3（<http://www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/software/>）

* 3：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

* 当社の [Perfect Real Time サポートシステム] は、ヒト、マウス、ラット、ウシ、イヌ、ニワトリ遺伝子の発現解析のためのリアルタイム RT-PCR 用プライマーを、オンライン検索 & ご注文いただけるシステムです。

本システムのプライマーは、リアルタイム PCR に SYBR® *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR820A）または SYBR® *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus)（製品コード RR420A）を用いる 2 ステップリアルタイム RT-PCR の系に最適化されていますが、本キットを用いる 1 ステップリアルタイム RT-PCR にもご利用いただけます。

ただ、プライマーによっては 1 ステップの系では十分に性能を発揮できない場合がありますので、その場合には SYBR® *Premix Ex Taq* II (Tli RNaseH Plus) または SYBR® *Premix Ex Taq* (Tli RNaseH Plus) を用いる 2 ステップリアルタイム RT-PCR をお試しください。

IX. 関連製品

One Step SYBR® PrimeScript® PLUS RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR096A/B)
One Step SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (製品コード RR086A/B)
One Step PrimeScript® RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (製品コード RR064A/B)
SYBR® *Premix Ex Taq*™ II (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR820S/A/B)
SYBR® *Premix Ex Taq*™ (Tli RNaseH Plus) (製品コード RR420S/A/B)
SYBR® Premix DimerEraser® (Perfect Real Time) (製品コード RR091A/B)
Premix Ex Taq™ (Probe qPCR) (製品コード RR390A/B)
Thermal Cycler Dice® Real Time System II (製品コード TP900/TP960)
Thermal Cycler Dice® Real Time System Single (製品コード TP850/TP870)
Thermal Cycler Dice® Real Time System *Lite* (製品コード TP700/TP760)
Smart Cycler® II System (製品コード SC200N/SC210N)
NucleoSpin® RNA (製品コード 740955.10/.50/.250)
RNAiso Plus (製品コード 9108/9109)

X. 参考文献

- 1) 吉崎美和, 向井博之 (2005) 実験医学別冊 バイオ実験で失敗しない! 「検出と定量のコツ」, 第3章 核酸の検出と定量のコツ 4. リアルタイム定量 PCR のコツ, 120-126
- 2) 吉崎美和, 向井博之 (2008) 実験医学別冊 原理からよくわかる「リアルタイム PCR 実験ガイド」 [3] 1) リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析, 39-43

XI. 注意

- ・本製品は、研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する最新の情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

[L11] SYBR® Green I

This product is covered by the claims of U.S. Patent No. 5,436,134 and 5,658,751 and their foreign counterpart patent claims.

Takara PCR products containing SYBR® Green I are sold under license from Molecular Probes Inc. only for the usage in Real-time PCR for internal research purpose. These products are not to be used for the purpose such as; providing medical, diagnostic, or any other testing, analysis or screening services or providing clinical information or clinical analysis in return for compensations.

[L15] Hot Start PCR

Licensed under U.S. Patent No. 5,338,671 and 5,587,287 and corresponding patents in other countries.

[L46] SYBR/Melting Curve Analysis

The purchase of this product includes a limited, non-transferable license for all fields other than human or veterinary in vitro diagnostics under specific claims of U.S. Patent Nos. 6,174,670, 6,569,627 and 5,871,908, owned by the University of Utah Research Foundation or Evotec Biosystems GmbH and licensed to Idaho Technology, Inc. and Roche Diagnostics GmbH, to use only the enclosed amount of product according to the specified protocols. No right is conveyed, expressly, by implication, or by estoppel, to use any instrument or system under any claim of U.S. Patent Nos. 6,174,670, 6,569,627 and 5,871,908, other than for the amount of product contained herein.

[L52] Rox Reference Dye (Research Field)

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,928,907. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

[M57] LA Technology

This product is covered by the claims 6-16 outside the U.S. corresponding to the expired U.S. Patent No. 5,436,149.

製品についての技術的なお問い合わせ先

Takara テクニカルサポートライン

Tel 077-543-6116 Fax 077-543-1977

ホームページアドレス <http://www.takara-bio.co.jp/>

タカラバイオ株式会社